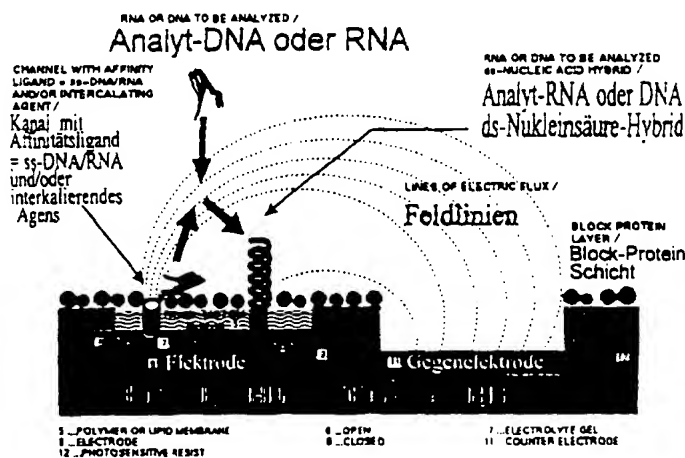




(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 27/327, C12Q 1/00	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/20203 A1 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. Juni 1997 (05.06.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT96/00230 (22) Internationales Anmeldedatum: 21. November 1996 (21.11.96)	(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Prioritätsdaten: A 1943/95 28. November 1995 (28.11.95) AT A 485/96 14. März 1996 (14.03.96) AT	Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.
(71)(72) Anmelder und Erfinder: SCHALKHAMMER, Thomas [AT/AT]; A-3072 Kasten Nr. 105 (AT); PITNER, Fritz [AT/AT]; Khekgasse 40-42/11, A-1230 Wien (AT).	

(54) Title: **NOVEL MEMBRANES AND MEMBRANE DNA/RNA SENSORS**

(54) Bezeichnung: **NEUARTIGE MEMBRANEN UND MEMBRAN-DNA/RNA-SENSOREN**



(57) Abstract

The invention concerns a novel highly sensitive membrane sensor which, in particular using a novel membrane structure. Either the interaction between lipid layers is reinforced, using the reaction between organoboron compounds, and/or stable lipids of the general formulae according to figure 4 are used. This novel sensor is designed as a hybridization-controlled membrane channel biosensor. The membrane channel biosensor uses the bonding of DNA and RNA to an immobilized catcher oligonucleotide to control a membrane channel.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein neuartiger hochsensitiver Membransensor beschrieben, der insbesondere unter Nutzung eines neuartigen Membranaufbaus, wobei entweder die Interaktion von beliebigen Lipidschichten unter Nutzung der Wechselwirkung von Organoborverbindungen verstärkt wird und/oder stabile Lipide der allgemeinen Formeln nach Figur 4 verwendet werden, als Hybridisierungs-gesteuerter Membrankanai-Biosensor, welcher die Bindung von DNA und RNA an ein immobilisiertes Fängeroligonukleotid zur Steuerung eines Kanals in einer Membran nutzt, konstruiert ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Neuartige Membranen und Membran-DNA/RNA-Sensoren

Die Erfindung bezieht sich auf die Konstruktion eines Membran-basierenden Sensortyps, welcher durch Verwendung neuartiger Membran- und Membran-Traeger-Systeme und/oder durch Nutzung der Nukleinsaeure-Hybridisierung zum Bau von insbesondere DNA- und RNA-Sensoren geeignet ist.

Als Nachweissysteme für beliebige biologische Moleküle sind Enzymsensoren bekannt, die die katalytische Wirkung von Biomolekülen verwenden, um ein spezifisches Biosignal z.B. die Konzentration von Milchsaeure, Zucker, Aminosaeuren... in ein unspezifisches chemisches Signal z.B. Konzentration von Wasserstoffperoxid umzuwandeln, welches sodann elektrochemisch in eine elektrische Groeße umgewandelt wird, die der gesuchten Analytkonzentration proportional ist. Als Nachweissysteme für DNA und RNA sind Enzym-markierte Assays (Northern-, Southern-Blott, PCR + ELISA,...) bekannt, die die katalytische Wirkung von Enzymen verwenden, um ein spezifisches Biosignal d.h. die Hybridisierung von DNA und RNA mit Hilfe eines z.B. Enzymlabels in ein unspezifisches chemisches Signal z.B. Konzentration von oxidiertem ABTS, in p-Nitrophenylphosphat, Indigoblau... umzuwandeln, welches sodann elektrochemisch oder optisch ausgewertet wird. Es ist bekannt, daß diese Assays eine gute Sensitivitaet jedoch grundlegende Probleme durch unspezifische Hybridisierung und komplizierte Durchführung aufweisen. Als Nachweissysteme für DNA und RNA sind weiters optische Systeme wie Surface Plasmon Resonance - Sensoren bekannt, welche die Hybridisierung von DNA und RNA auf einem Sensorchip in ein optisches Signal umzuwandeln vermögen. Es ist jedoch weiters bekannt, daß der große apparative Aufwand und die im Vergleich zu den Enzymassays maeßige und daher für viele Anwendungen nicht ausreichende Empfindlichkeit dieser Sensoren diese Technik nur für manche Bereiche einsetzbar macht.

Die Erfindung zielt darauf ab, durch einen neuen Sensorprinzip und/oder einer neuartigen selektiven Membran die grundlegenden Einschränkungen insbesondere in der Nukleinsaeureanalytik zu beseitigen. Die essentielle Biokomponente soll in diesem Sensoraufbau nicht zur katalytischen Verstaerkung der Analytbindung Verwendung finden, sondern als selektive Barriere zur umgebenden Loesung. Der Analyt z.B. DNA oder RNA dient sodann direkt oder indirekt zur Steuerung des Ionenkanals. Durch diesen Ionenkanal koennen pro Sekunde und Kanal bis zu 10 Millionen Ionen in einen schmalen ($< 10 \mu\text{m}$) Membran-Elektrodenraum einfließen und dieser Ionenfluß direkt elektrochemisch (etwa 1-10 pA je offener Kanal), konduktometrisch, fluonmetrisch oder mit einer anderen geeigneten Methode bestimmt werden. Eine Stoerung des Meßsignals durch andere Komponenten der Loesung wird durch die selektive Membran unterdrückt. Die vorliegende Erfindung nutzt die genaue Immobilisierung eines kleinen Oligonukleotids und/oder einer interkalierenden Substanz am Eingang des Kanals. An diese wird anschließend der große Analyt (z.B. DNA oder RNA) am Kanaleingang selektiv gebunden.

Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich von US 5.234.566 durch den Aufbau und die Verankerung der Membranen. Auch ist die Aufbringung der Membran nicht nur durch „self assembling“ möglich, sondern kann auch durch andere Techniken erfolgen (z.B. LB-Filme).

Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich von EP 0 441 120 A2 durch die nicht notwendige Vernetzung der Lipidmembran mit der Elektrodenoberfläche durch überbrückende Moleküle. Der dauernde Kontakt mit zwei wässrigen Phasen ober- und unterhalb der Membran (Zeichen einer nicht stabilen Membran), ist kein notwendiger Teil der vorliegenden Erfindung. Die Verwendung einer Rahmenstruktur, über die sich die Lipidmembran weitererstreckt, vermeidet apolare Wände, an die die Lipidmembran grenzt, welche instabile und daher undichte Stellen der Membran darstellen würden.

Die vorliegende Erfindung beinhaltet nicht die in WO 94/07593 geforderte direkte Vernetzung der Lipidmembran mit der Elektrodenoberfläche unter Verwendung überbrückender Linkerlipide oder den zwangsweisen Einbau von Ionophoren.

Der neuartige Membranaufbau beruht auf folgenden Erkenntnissen:

Als Ionenkanäle können z.B. die sehr gut untersuchten und leicht zugänglichen Kanalpeptide der Gramicidinfamilie als Basis des neuen Hybridisierungssensors dienen. Sowohl die Sequenzen als auch genaue Moleküldaten unterschiedlicher Gramicidinderivate konnten in den letzten Jahren bestimmt werden. Die Sequenzhomologien sind durchwegs hoch. Die Ionenkanäle werden dabei durch 2 assoziierte Moleküle Gramicidin gebildet. Die Raumstruktur des Peptids ist dabei eine 6.3 bzw. β - Helix, die zentral einen offenen Ionenkanal bildet und mit Tryptophanresten an den beiden Membranseiten dynamisch verankert ist.

Es konnte durch Patch Clamp Techniken gezeigt werden, daß an beiden Seiten der Membran Gramicidin - Monomere eingeschränkt frei floaten. Kommt es zu einer Assoziation zweier Moleküle Gramicidin von unterschiedlichen Membranseiten, so bildet sich ein durchgängiger Ionenkanal. (siehe Fig. 1). Chemische Modifikationen der Gramicidinpeptide am N - Terminus können nach Deformylierung zwei Moleküle Gramicidin zu einem kovalenten Dimer (z.B. mit Oxalsäure oder Malonsäure als Bisamide) verknüpfen. Diese Gramicidin-Dimere bilden z.B. die im Sinne der Patentanmeldung notwendigen stabilen Ionenkanäle in natürlichen und künstlichen Membranen. Öffnet oder schließt sich ein einzelner Ionenkanal in der Membran, so kann dies direkt durch einen Ionenstrom von etwa 10 Millionen Ionen je Sekunde durch den Membrankanal gemessen werden. Bisgramicidinmoleküle sind als Ionenkanäle im Sinne der Patentanmeldung besonders gut geeignet durch ihre hohe Stabilität, die gute chemische Charakterisierung, die Möglichkeit einer Vielzahl chemischer Modifikationen und insbesondere durch die hohe Leitfähigkeit der Kanäle.

Die zweite Teil des neuartigen Sensorkonzepts ist die Membrantechnologie. Es wird dabei der Vorteil der „black lipid membranes“ d.h. der freie Zugang zu beiden Membranseiten mit dem Vorteil der „self assembling membranes“ d.h. der stabilen Anordnung eines selbst aufbauenden Lipidfilms kombiniert. Die Wahl eines Photo- oder Elektropolymer als Trägermatrix für den Lipidfilm und die kovalente Kopplung der Lipidmonomere an diese Geloberflaeche stabilisiert den Lipidfilm gegen mechanische Zerstörung, bzw. gegen das Flößen des zweiten Lipidfilms der Doppelmembran.

Dünnschichttechnologische Verfahrensschritte sind ein weiterer wichtiger Teil im Rahmen des Sensoraufbaus. Dabei soll zuerst der elektrochemische Sensor nach etablierten dünnsschichttechnologischen Verfahren gefertigt werden. Sodann wird mit Photolacken z.B. aus der AZ - Serie (z.B. AZ 1505) die Rahmenstruktur für den Lipidfilm aufgebaut. Der naechste Schritt ist sodann die Füllung der hydrophoben Rahmenstruktur mit einem hydrophilen Gel Photopolymer als Trägersystem für die Lipidmembran. Diese beiden Schritte koennen technologisch vorteilhaft auch in umgekehrter Reihenfolge ausgeführt werden.

Die Kopplung des Faengeroligonukleotids an den Gramacidin Kanal erfolgt durch selektive chemische Modifikation der carboxyterminalen Struktur.

Die Erfindung zielt darauf ab, eine neuartiges, hochsensitives Sensorprinzip mit der Erfassung einzelner Moleküle zu schaffen. Die Empfindlichkeit wird real durch die Bindungskonstante (z.B. DNA/DNA bzw. RNA/DNA) und durch den Zeitbedarf des Aufeinandertreffens der beiden Nukleinsaeuremoleküle begrenzt.

Weiters zielt die Erfindung auf den Aufbau solcher Sensoren mit Dünnschichttechnologie-kompatiblen Methoden wie Dünnschichtsubstraten, Sputtern und Aufdampfen der Metallelektroden, Einsatz von Photolacken und mit photosensitiven Polymeren hergestellten, dünnsschichttechnologischen Lipidmembranträgem ab und beinhaltet darüber hinaus auch den neuartigen Aufbau von Lipid- oder Polymermembranen an Phasen-Grenzflaechen.

Die DNA-Analytik stellt immer größere Anforderungen an die Selektivitaet und Sensitivitaet von Meßsystemen. Schnellere und insbesondere einfachere Testverfahren in der DNA-Diagnostik ermoeeglichen vielfach erst die routinemaäßige Bestimmung von Tumorgenen, Viren, Erbkrankheiten,... in der Arztpraxis oder zumindest abseits etablierter Universitaetskliniken. Darüber hinaus kann auch die direkte Messung durch den Patienten neuartige Moeglichkeiten eroeffnen.

Der Einsatz des neuen Sensortyps ermoeeglicht die Nutzung der Faehigkeit zur Hybridisierung von Analyt-DNA und -RNA mit Faengeroligonukleotiden am Sensorkopf. Der Einsatz der neuen Membranen ermoeeglicht den Aufbau neuer Sensortypen unter Nutzung nahezu aller biochemischer und chemischer Affinitaetsreaktionen. Ein solcher Sensor kann

z.B. nach folgenden Arbeitsschritten aufgebaut werden: Chemische Synthese eines selektiven Membrankanals, dünnschichttechnologischer Sensoraufbau, Polymermembranaufbau, Lipidcoating, Einbau der Membrankanäle und Assemblieren. Eine Kombination der erfindungsgemäßen Verfahrensschritte kann zu einem Sensoraufbau nach folgendem Konzept führen:

- * Synthese eines Ionenkanals z.B. Bisgramicidin A
- * Kovalente Kopplung von Oligonukleotiden an oder nahe dem Kanaleingang,
- * Sensoraufbau mit Dünnschichttechnologie,
- * Membrancoating des Sensors,
- * Einbau der Faengeroligonukleotid-modifizierten Ionenkanäle,
- * Einbau in ein Gehäuse.

Die Kopplung des Faengeroligonukleotids an das carboxyterminale Ethanolamin (des Gramicidin A) erfolgt durch Aktivierung der beiden freien terminalen OH - Gruppen des Moleküls mit z.B. Divinylsulfon, Chlorameisensäure-nitrophenylester, oder durch Umwandlung in eine Jod- bzw. Brom-Gruppe. Sodann kann das linkermodifizierte Oligonukleotid durch seine terminale NH_2 bzw. SH Gruppe selektiv gebunden werden. Es koennen auch beide terminalen OH - Gruppen des Bisgramicidins mit Divinylsulfon oder Chlorameisensäure-nitrophenylester aktiviert und mit einem Diamin (Ethylendiamin) oder einer Dimercaptoverbindung umgesetzt werden. Das sich durch die Umsetzung bildende Bisgramicidinderivat traegt sodann zwei terminale reaktive Amino (oder SH)- Gruppen. Die Kopplung der Faengeroligonukleotide ist unter Beispiele beschrieben.

Die Fertigung der Sensorchips folgt dann dem Schema der aufgelisteten Beispiele.

Der Traeger der Lipid- oder Polymermembran baut sich aus zwei unterschiedlichen photostrukturierbaren Polymeren auf : Einer Rahmenstruktur aus hydrophobem d.h. lipophilem Photolack und einem hydrophilen Photopolymer innerhalb der Rahmenstruktur als Membrantraeger.

Die Rahmenstruktur aus hydrophobem d.h. lipophilem Photolack kann durch photostrukturierbare Polymere aus der Halbleiterindustrie aufgebaut werden. Es eignen sich dafür die etablierten Photolacke vom Typ AZ (Hoechst), die durch nachfolgendes Einbacken bei Temperaturen über 150 Grad voellig vernetzten und daher voellig unlöslich werden. Ausgehend von den in den letzten Jahren entwickelten hydrophoben Photolacken aus der Halbleiterindustrie koennen analog auch hydrophile Polymersysteme aufgebaut werden. Dabei koennen hydrophile Polymervorstufen durch bivalente Photovernetzer kovalent verbunden werden. Es bildet sich ein Polymernetzwerk mit steuerbarer Porengröße, welches als strukturierbares Traegermaterial zur Immobilisierung von Membranen und Ionenkanäle dient. Insbesondere Polyvinylpyrrolidonpolymere mit hydrophilen Seitengruppen koennen als viskose Loesungen durch Spinnprozesse auf die

Sensorrohlinge aufgebracht werden und durch Photocrosslinker (meist Carben und Nitren - Bildner z.B. 4,4'-Bisazidostilben-2,2'-disulfonsaeure) mit langwelligem UV (360 nm) zu Polymerfilmen vernetzt werden. Die reaktiven funktionellen Gruppen des Polymers koennen dann aktiviert und zur Kopplung von Proteinen, Peptiden und Lipiden verwendet werden. Da Lipidfilme sowohl untereinander als auch an der Zellwand nicht durch kovalente Wechselwirkungen gebunden sind, koennen sie leicht unter desintegrierenden Bedingungen extrahiert werden. Dazu eignen sich hydrophobe Agenzien, Detergentien und Alkalien.

Zum Aufbau einer stabilen Lipidmembran muessen zwei grundsaeztliche Probleme geloest werden : Stabile Bindung des Lipidfilms an die Unterlage und das Verhindern des Abfloatens des oberen Lipidfilms im Lipiddoppellayer. Die stabile Bindung des unteren Lipidfilms an die Geloebeflaeche erfolgt durch hydrophobe, ionische oder kovalente Kopplung von z.B. Thiolipiden an eine chemisch reaktive Oberflaeche. Dabei wird vor der Aufbringung des Thio-Lipidfilms auf die Oberflaeche dieselbe in folgender Weise modifiziert : Einfuehrung reaktiver Gruppen (z.B. durch Sauerstoff- oder Chlorplasma) und Kopplung der reaktiven Gruppen mit bivalenten Crosslinkern wie z.B. Divinylsulfon. Der in der genannten Weise aktivierte Sensor wird in ein Bad mit in organischem Loesungsmittel geloesten Thio - Lipiden getaucht, es erfolgt das „self assembling“ und die kovalente Bindung des Lipidfilms. Ein Anteil an frei beweglichen Lipiden ermoeeglicht die fluide Struktur der Lipidmembran.

Bei Verwendung von nicht bolaamphiphilen Esterlipiden - analog eukaryontischen Zellen - muss der zweite Lipidfilm am Ersten kovalent gebunden verankert werden.

Die Verwendung der neuartigen zyklischen Transmembranlipide ersetzt eine herkoemmliche Doppellayermembran. Die zyklischen Lipide koennen in einer optimierten Synthese mit hoher Ausbeute gewonnen werden (meist 10 - 50 %). Die Lipide weisen aehnliche aber optimierte Struktur wie Tetraetherlipide aus manchen insbesondere thermophilen Bakterienmembranen auf. Der Aufbau als makrozyklisches Ringsystem ermoeeglicht eine hohe Stabilitaet und groesse thermische Belastbarkeit. Weiters ist ein Coating mit einem einzelnen Tauchvorgang durch eine Lipidgrenzschicht moeglich. Insbesondere die Kombination mit Boronsaeuren optimiert zusaetzlich die Haftung jeder Lipidmembran an einer meist hydrophilen Oberflaeche. Dabei kommt es zu einer Wechselwirkung von Organoboronsaeuren mit vicinalen cis-Diolen der jeweils anderen Phase. Diese Art der Haftungsverstaerkung ist den anderen insbesondere durch den geringen Platzbedarf des Bors ueberlegen, da dadurch die Lipidphase in keiner Weise verzerrt wird.

Die stabile Haftung des Lipidfilms an der Geloebeflaeche erfolgt durch hydrophobe, ionische oder kovalente Wechselwirkung der Lipide mit der Supportoberflaeche. Dabei kann vor der

Aufbringung des Lipidfilms die Oberfläche des Supports z.B. durch Einführung reaktiver OH - Gruppen unter Anwendung von Sauerstoffplasma für die Interaktion mit Boronsäure-modifizierten Lipiden aktiviert werden. Der in der genannten Weise aktivierte Sensor wird sodann in ein Bad mit in organischem Lösungsmittel gelösten Lipiden getaucht, es erfolgt der Aufbau der Membran. In analoger Weise kann die Aufbringung der Lipide auch durch Tauchen in einem LB-Trog mit gespreiteten Lipiden erfolgen. Der LB-Trog wird dabei im Autopressure-Modus betrieben und der Druck im Bereich der semifluiden bzw. kristallinen Modifikation gehalten. Der Support wird langsam durch die Lipidgrenzschicht geführt, wobei sich die Membran an dessen Oberfläche ausbildet.

Ein zweiter Lipidfilm wird nicht benötigt, da die neuartige Membran bereits eine Doppellipidlayer ersetzen kann. Ein Anteil an frei beweglichen Lipiden kann der Membran bei Bedarf zugesetzt werden und ermöglicht den Übergang von einer semikristallinen zu einer fluiden Struktur der Lipidmembran.

Der Einbau des DNA/RNA-modifizierten Kanals erfolgt zugleich mit dem „self assembling“ des Lipidfilms. Ein Liganden - modifiziertes Bisgramicidin besitzt noch eine freie reaktive Gruppe am zweiten Carboxyterminus des Bisgramicidinmoleküls. Diese kann in analoger Weise wie die Lipide kovalent mit der Oberfläche koppeln und so den Kanal fest (d.h. kovalent) mit dem Trägerpolymer verbinden.

Der Lipidfilm kann jedoch auch durch eine beliebige andere Membran ersetzt werden, da es im Sensor-Setup die Aufgabe der Membran ist, zwei unterscheidbare Kompartimente zu schaffen. Analog der Technologie ionensensitiver Elektroden kann z.B. Polyvinylchlorid mit hohem Weichmacheranteil als Membranmatrix verwendet werden. Auch hydrophobe Schichten z.B. aus Teflon, durch Plasmapolymerisation aufgebracht, eignen sich als Membranmatrix. Durch Leitfähigkeit und Impedanz kann die Ausbildung von Inhomogenitäten und die Dichtheit der Lipidmembranschichten auf Metalloberflächen direkt beobachtet und quantifiziert werden.

Leitfähigkeits- und Strommessungen ähnlich der Patch Clamp Messung an Ionenkanälen in intakten Zellen oder an Membranfragmenten sind das Meßprinzip des Membrankanalbiosensors. Die in der genannten Weise aufgebauten Sensoren liefern als z.B. Mikroleitfähigkeitsbiosensoren ein dem Ionenfluß proportionales Stromsignal. Als Meßaufbau sind mit Elektrometerverstärkern (z.B. OPA 111 oder 128 Burr Brown) ausgestattete Verstärker geeignet. Auch alle Meßplätze für Einzelionenkanalmessungen in der Patch Clamp Technik im Bereich bis 0.1 pA sind für die neuartigen im Rahmen der Erfindung beschriebenen Sensoren geeignet.

Die Erfindung wird nachfolgend an Hand von Ausführungsbeispielen näher erläutert .

Beispiel 1 : Aufbau der Sensorsubstrate

Verwendung von Sensorsubstraten aus Alkali-, Pyrex-Glas, Aluminiumoxid oder Kunststoff (z.B. Polyimid)

- Herstellung von Photomasken über CAD, DXF - File und Patterngenerator
- Herstellung von Tochtermasken
- Hochvakuumbedampfung bzw. Sputtern der Elektroden
- 50 nm Titan, 100 nm Gold,
- Anlage : Balzers, ESQ 110, BB800 059BD mit 270°

Elektronenstrahlumlenkkanone bei $2 \cdot 10^{-5}$ Torr, 150°C 1 nm/s
bzw. Laboranlage der Fa. Balzers

- Photolack AZ5218 E, positiv 4000 rpm, 30 s
- Mask-aligner : Karl Süss Modell MA 45, 360 nm 350 W , 7.5 s
- Photolack - Entwickler AZ - Developer / Hoechst 60 s
- Einbacken bei 120°C , 30 min
- Gold aetzen mit KI/I_2
- Titan aetzen mit gepufferter HF
- 30 min, 80°C, Ultraschall mit AZ - Remover
- Ethanol Waschschrift
- Kaschieren auf Haftfolie
- Saegen der Wafer mit 100 µm Diamantsaege

Beispiel 2 : Reinigung des Gramacidin A

Gramicidin A wird von Gramicidin B und C aus der Mischung (= Gramicidin D) auf einer SI - 100 Polyol Saeule der Firma Serva mit einem Gradient von 0 - 80 % Methanol getrennt.

Beispiel 3 : Carboxyterminale Modifikation des Gramacidins

500 mg Gramicidin A werden mit 10 ml Benzol gerührt, ein 3 - 5 facher Überschuß des Carboxylgruppen modifizierten Liganden zugegeben und mit 10 fachem molaren Überschuß eines Carbodiimids (z.B. Dicyclohexylcarbodiimid) versetzt. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur im Dunkeln vorgenommen. Der Verlauf der Reaktion wird auf Silicagel - Platten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Chloroform / Methanol / Wasser : 100/10/1) verfolgt.

Das Reaktionsgemisch wird sodann auf einer praeparativen C-18 Reversed Phase Saeule mit Methanol / Wasser gereinigt.

Beispiel 4 : Synthese des Bisgramicidins

Das Ausgangsprodukt ist desformyliertes Gramicidin A welches durch Spaltung von Gramicidin A mit wasserfreier Salzsäure in Methanol und nachfolgende Reinigung in präparativen C-18 reversed phase Säulen mit Methanol / Wasser synthetisch gewonnen wird.

Die Dimerisierung des desformylierten Gramicidin A erfolgt durch Zusatz eines 5 fachen molaren Überschusses von Diphenylphosphorylazid zu einer Lösung von einem molaren Teil des desformylierten Gramicidin A's und einem Überschuß der Dicarbonsäure 3 - 10 fach (z.B. Oxalsäure, Malonsäure) in Dimethylformamid unter -10°C. Die Reaktionsdauer bei 0 °C beträgt 24 - 48 Stunden. Nach Stoppen der Reaktion mit Ethanol wird das Reaktionsgemisch nach einigen organisch / wässrigen Extraktionsschritten zur Trockene eingedunstet und nach Aufnehmen des Rückstands in einer kleinen Menge Methanol auf einer präparativen C-18 Reversed Phase Säule mit dem Laufmittelsystem Methanol / Wasser (90 / 10 bis 95 / 5) gereinigt.

Beispiel 5 : Aufbau der Rahmenstruktur

- * Der Photolack AZ 1505 wird durch Spincoaten auf den Sensorchip aufgebracht (7000 rpm, 2 min).
- * Softbake bei 80 °C für 30 Minuten
- * Belichtung mit Photomaske mit UV (365 nm) 5 s
- * Postbake bei 80 °C für 5 Minuten
- * Entwickeln mit einer 2.83% Tetraethylammoniumhydroxid-Lösung 60 s
- * Curing : 1 h auf 160 °C

Beispiel 6 : Aufbau des hydrophilen Lipidträgerpolymers

Das hydrophile photovernetzte Gel wird nach folgender Vorschrift aufgebaut :

2.5 % (w/v) PVP (Polyvinylpyrrolidon MW : 360.000 oder 1.000.000) in destilliertem Wasser und 0.75 % (w/v) 4,4'-Diazidostilben-2,2'-disulfonsäure in destilliertem Wasser werden gemischt (3:2 v/v). Die Präpolymerlösung wird entweder in die Photolackrahmenstruktur pipettiert oder der Sensor wird durch ein Eintauch- oder Spinbeschichtungsverfahren mit der Präpolymerlösung überzogen.

Das Photopolymer wird durch Belichten mit einer 50 W Quecksilberdampflampe für 5 s durch Einwirken von UV-A und UV-B gehärtet und überschüssiger Vernetzer durch einen Waschschrift in Phosphatpuffer 0.1 M, pH = 7.0 entfernt.

Beispiel 7: Reinigung von Platinsensorelektroden

Nach der Verwendung von löslichen Thio-Verbindungen sind Metalloberflächen chemisch bzw. elektrochemisch blockiert = deaktiviert. Um die kovalente Bindung der Thiole mit der Elektrodenoberfläche zu brechen, wird die Elektrode elektrochemisch zwischen -600 und +1200 mV (bis in den Bereich der Sauerstoffentwicklung) versus Ag/AgCl gereinigt. Die elektrochemische Reinigung erfolgt durch Anlegen einer zeitlich variablen Spannung an einen in neutralen Puffer eingetauchten Sensor.

Beispiel 8 : Lipid- und Kanalbeschichtung der Sensorelektroden

Die in einem organischen Lösungsmittel gelösten Lipide (2-30 µg /100 cm² Oberfläche) und modifizierte Ionenkanäle (10 - 10⁸ Moleküle / mm²) werden an einer Luft/Flüssigkeit-Phasengrenze auf einem LB-Trog gespreitet. In einem automatisierten LB-System wird der Lipidfilm von einer fluiden in eine semikristalline Phase komprimiert. Der Sensor wird sodann durch den Lipidfilm gezogen wobei ein Nanoaktuator der Firma Physik-Instrumente/Deutschland (von einem DC-Motor mit der Auflösung von 60nm angetrieben) verwendet werden kann.

Ungesättigte Lipidfilme werden mit einer Photomaske bedeckt und durch das Licht einer 50W Mitteldruck Quecksilberdampf Lampe etwa 120 Sekunden vernetzt. Dabei werden die Lipide sowohl innerhalb der Lipidschicht als auch mit einem reaktiven Träger vernetzt. Der Einbau modifizierter Kanäle kann in analoger Weise mit Mischungen aus Lipid und Kanalpeptiden erfolgen.

Beispiel 9 : Kopplung von SH-Oligonukleotiden an ein NH₂-Kanalpeptid

Ein Kanalpeptid mit reaktiver NH₂-Gruppe (20mg/ml) wird in Phosphatpuffer 0.1 M / EDTA 0.1 M gelöst (bei hydrophoben Peptiden unter Zugabe eines Lösungsvermittlers) und 0.5-5mg/ml Sulfosuccinimidyl-(4-jodacetyl)aminobenzoat zugegeben. Die Reaktionsdauer beträgt bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz 20-60 Minuten. Nach der Abtrennung des Kopplungsreagenzes durch HPLC wird ein 1-5 fach molarer Überschuss an SH-modifiziertem Oligonukleotid zugegeben. Die Reaktionsdauer beträgt bei 4°C und unter Lichtschutz 8 -16 Stunden. Als Reaktionslösung kann ein Phosphatpuffer 0.1 M mit 0.1 M EDTA pH = 8.3 verwendet werden. Der Überschuss an reaktivem Kanalpeptid wird mit Cystein abgefangen und die Mischung auf einer semipräparativen HPLC-Säule gereinigt.

Beispiel 10 : Kopplung von NH₂-Oligonukleotiden an ein SH-Kanalpeptid

Ein Oligonukleotid mit reaktiver, terminaler NH₂-Gruppe (20mg/ml) wird in NaHCO₃ 0.2 M / EDTA 0.1 M, pH = 9.3 gelöst (bei hydrophoben Peptiden unter Zugabe eines Lösungsvermittlers) und 0.5-5mg/ml Sulfosuccinimidyl-4N-maleinimidomethyl cyclohexan-1-

carboxylat zugegeben. Die Reaktionsdauer betraegt bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz 10-30 Minuten. Nach der Abtrennung des Kopplungsreagenzes durch HPLC wird ein 1-5 fach molarer Überschuß an SH-modifiziertem Kanalpeptid zugegeben. Die Reaktionsdauer betraegt bei 4°C und unter Lichtschutz 8 -16 Stunden. Als Reaktionsloesung kann ein Phosphatbuffer pH=7.0, 0.1M mit 0.1M EDTA, verwendet werden. Der Überschuß an reaktivem Kanalpeptid wird mit Cystein abgefangen und die Mischung auf einer semipraeparativen HPLC-Saeule gereinigt.

Beispiel 11 : Kopplung von NH₂-Oligonukleotiden an ein NH₂-Kanalpeptid

Ein Oligonukleotid mit reaktiver, terminaler NH₂-Gruppe (20mg/ml) wird in 0.2 M NaHCO₃ pH = 9.3 geloest (bei hydrophoben Peptiden unter Zugabe eines Loesungsvermittlers) und 1-5mg/ml Bis(sulfosuccinimidyl)suberat zugegeben. Die Reaktionsdauer betraegt bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz 5-20 Minuten. Nach der Abtrennung des Kopplungsreagenzes durch HPLC wird ein 1-5 fach molarer Überschuß an NH₂-modifiziertem Kanalpeptid zugegeben. Die Reaktionsdauer betraegt bei 4°C und unter Lichtschutz 8-16 Stunden. Als Reaktionsloesung kann 0.2 M NaHCO₃ pH = 9.3 verwendet werden. Der Überschuß an reaktivem Kanalpeptid wird mit Cystein abgefangen und die Mischung auf einer semipraeparativen HPLC-Saeule gereinigt.

Beispiel 12: Oligonukleotide für einen Herpes-Virus Sensor

Als Faengeroligonukleotide werden komplementaere Sequenzen von 15-30 bp zu Sequenzen aus der Viruspolymerase auf einem Oligonukleotidsynthesizer gewonnen. Als Sequenzen werden komplementaere Sequenzen zu den Nukleotidsequenzen die den folgenden Aminosaeuresequenzen entsprechen verwendet:

Herpes I:	PAGPRGAGRG ERPEEEGEDE
Herpes II:	PHNPRGATQT GDGNGDEDLD
Humaner Herpes VI:	RILPRGIMHD RQGIGYKGAT
Cytomegalovirus:	PGSAQGSQKR VSPGSGSNSS
Varicella-Zoster:	RGSNREFLHS DVIPDVGDVE
Epstein-Barr:	LRLIPKCFQT ILPMPSASDR

Beispiel 13: Oligonukleotide für einen HIV1/2-Virus Sensor

Als Faengeroligonukleotide werden komplementaere Sequenzen von 15-30 bp zu Sequenzen aus dem Protein gp41 auf einem Oligonukleotidsynthesizer gewonnen. Als Sequenzen werden komplementaere Sequenzen zu den Nukleotidsequenzen die den folgenden Aminosaeuresequenzen entsprechen verwendet :

HIV1:	LGLWGCSGKLIC
	LGMWGCSGKLIC
HIV2:	LNSWGCAFRQVC

Beispiel 14: Aufbau einer Elektropolymerrmembranmatrix mit substituierten Polypyrrolen

Als Monomer koennen z.B.

- 1-Carboxyalkyl-pyrrol,
- 2-(1-Pyrroloacetyl)-glycin,
- 1-Alkylpyrrol,
- 4-Carboxybenzylpyrrol,
- 4-Nitrophenylpyrrol,
- 4-(3-Pyrrolo)-4-ketobuttersaeure,

3-((Keto-4-nitrophenyl)methyl)pyrrol oder analoge Verbindungen verwendet werden.

Die Monomere werden in 0.5 prozentiger Loesung in Acetonitril geloest und 2.5 % Leitsalz (LiClO_4 , NR_4BF_4 , NR_4PF_6 , $\text{R}=\text{Alkyl}$) zugegeben. Die klare Loesung wird 10 Minuten mit Argon gespült. Dann werden die Elektroden cyclovoltammetrisch mit den Elektropolymereen überzogen (Scangeschwindigkeit = 100mV/s). Der Spannungsbereich wird dabei so gewaehlt, daß eine deutliche anodische Stromzunahme durch den Polymerisationsvorgang waehrend der ersten Zyklen beobachtet werden kann z.B. -300 bis 1400 mV versus Ag/AgCl.

Beispiel 15 : Reduktion von 1,24-Tetracosandisaeure (Figur 2)

Ansatz 1: 0.005 mol 1,24-Tetracosandisaeure (2 g)
 0.0083 mol LiAlH_4 (8.3 ml einer 1M Lösung in THF)
 60 ml Pyridin getrocknet über Molekularsieb 4Å

Die Tetracosandisaeure wird in 60 ml trockenem Pyridin gelöst, das LiAlH_4 unter Rühren zutropft. Anschließend wird die Reaktionslösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf Eiswasser gegossen, der Niederschlag abgenutscht, mit 3N HCl, H_2O und gesaettigter NaCl Lösung gewaschen und aus Toluol umkristallisiert. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen, wird eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt

Laufmittel: Toluol/Dioxan/Essigsäure = 90/25/4

Sprühreagens: Vanillin-Schwefelsäure:

1g Vanillin wurde in 100 ml Schwefelsäure gelöst.

Anschließend wird auf 160°C erhitzt, bis Verfarbung eintritt.

Zur Strukturbestätigung kann ein NMR- oder Massenspektrum aufgenommen werden.

Ausbeute: 1.035 g (= 56% der Theorie)

Beispiel 16 : Synthese von Bis-(2-butendicarboxysäure)-1,24-tetracosandiylester (Figur 2)

Ansatz: 0.002 mol Maleinsäureanhydrid (0.196 g)

0.001 mol 1,24-Tetracosandiol (0.37 g)

Das Reaktionsgemisch wird in 6 ml trockenem Toluol (über Molekularsieb 4Å) mindestens 8 h refluxt. Beim Abkühlen fällt das Produkt aus. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen, kann eine Dünnschichtchromatographie (Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator 254 nm) durchgeführt werden.

Laufmittel: Toluol/Dioxan/Essigsäure = 90/25/4

Detektion: UV-Lampe, 254 nm

Ausbeute: 0.45 g (80% der Theorie)

Beispiel 17 : Synthese von 1,6,31,36 Tetraoxacyclohexaconta-3,33 dien-2,5,32,35 tetron (Figur 2)

Ansatz: 0.0005 mol

Bis-(2-butendicarboxysäure)-1,16-hexadecadiylester (0.283 g)

0.0005 mol 1,24-Hexadecadiol (0.185 g)

0.05 g p-Toluolsulfonsäure

Das Reaktionsgemisch wird in 45 ml Toluol unter Rückfluß mindestens 8 h gekocht. Das Lösungsmittel wird abgedampft und der Rückstand aus Ethylacetat umkristallisiert. Der Umsatz kann mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator 254 nm) verfolgt werden.

Laufmittel: Toluol/Dioxan/Essigsäure = 90/25/4

Detektion: UV-Lampe, 254 nm

Beispiel 18 : Synthese von Bis-(2-butendicarboxysäure)-1,16-hexadecadiylester (Figur 3)

Ansatz: 0.0116 mol Maleinsäureanhydrid (1.14 g)

0.0058 mol 1,16-Hexadecadiol (1.5 g)

Das Reaktionsgemisch wird in 35 ml trockenem Toluol (über Molekularsieb 4Å) mindestens 8 h refluxt. Beim Abkühlen fällt das Produkt aus. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen, kann eine Dünnschichtchromatographie (Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator 254 nm) durchgeführt werden.

Laufmittel: Toluol/Dioxan/Essigsäure = 90/25/4

Detektion: UV-Lampe, 254 nm

Ausbeute: 2.27 g (87% der Theorie)

Beispiel 19 : Synthese von 1,6,23,28 Tetraoxacyclotetratetraconta-3,25dien-2,5,24,27 tetron (Figur 3)

Ansatz: 0.0022 mol

Bis-(2-butendicarboxysäure)-1,16-hexadecadiylester (1 g)

0.0022 mol 1,16-Hexadecadiol (0.57 g)

0.22 g p-Toluolsulfonsäure

Das Reaktionsgemisch wird in 200 ml Toluol unter Rückfluß mindestens 8 h gekocht. Das Lösungsmittel wird abgedampft und der Rückstand aus Ethylacetat umkristallisiert. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen, wird eine Dünnschichtchromatographie (Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator 254 nm) durchgeführt.

Laufmittel: Toluol/Dioxan/Essigsäure = 90/25/4

Detektion: UV-Lampe, 254 nm

Ausbeute: 0.32 g

Patentansprüche:

1. Biosensor, dadurch gekennzeichnet, daß in Membranen Kanäle oder kanalbildende Moleküle eingebaut sind, an welchen entweder kovalent ein oder mehrere Oligonukleotide, Oligonucleotidanaloga, DNA- oder RNA-Moleküle immobilisiert sind oder der Aufbau der Membranen so vorgenommen wird, daß eine für Ionen impermeable Schicht aus Lipidmolekülen an eine für Ionen oder Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner als 1500 Dalton permeable Schicht angelagert ist, wobei entweder die Interaktion der beiden Schichten unter Nutzung der Wechselwirkung von Organoborverbindungen, bevorzugt Boronsäuren und deren Derivaten, verstärkt wird oder stabile Lipide der allgemeine Formel I verwendet werden, aber auch mit Vorteil die oben genannten Strukturelemente des Membranbiosensors kombiniert eingesetzt werden.

2. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran aus Lipiden aufgebaut ist, in welchen die die beiden Transmembranketten der Lipide nach Figur 4 durch die Linker Z1 und Z2 verbunden sind, wobei die Kettenlänge der Transmembranketten n bevorzugt gleich m ist, die Transmembranketten länger als 11 Atome sind, die Transmembranketten aus den Elementen Xa und/oder Xb, gewählt aus der Gruppe CH_2 , CH-Alkyl, $\text{C}(\text{Alkyl})_2$, CF_2 , O, S, C=O, p-Phenylen, aufgebaut sind und die terminalen funktionellen Gruppen Z1 und Z2 beliebige organische oder siliciumorganische Linker sind, wobei der Abstand der Kette X_1 von der Kette X_2 weniger als die Länge einer Kette von 6 Kohlenstoffatomen beträgt, die Linker entweder hydrophil sind oder eine reaktive Gruppe zur Kopplung an andere Moleküle tragen, bevorzugt bis zu drei Kohlenstoffatome lang sind und bevorzugt aus der Gruppe Oxalsäure, Malonsäure, Maleinsäure, Bernsteinsäure, Glutarsäure, Phtalsäure und deren Derivaten gewählt werden,

3. Biosensor nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Lipide der Membran nach Figur 4/1 durch Linker verbunden sind, welche bis zu drei Kohlenstoffatome lang sind und eine oder mehrere Seitengruppen mit hydrophilen oder polaren Resten bevorzugt Organoborsäurederivate und oder Organosilane tragen.

4. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran über Metall-, oder Halbleiterelektroden direkt oder mit einem Submembranzvolumen von weniger als 3 cm^3 auf dem Sensorsubstrat angebracht ist, wobei die aufgebrachten Elektroden durch Dünnschichttechnologie, Dickschichttechnologie oder aus dünnen gewalzten Metallfolien gefertigt sind.

5. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran durch wasserhaltige und/oder leitfähige kovalent oder ionisch vernetzte Polymere, Biopolymere, Gele, Dendrimere oder kristalline Festkörper getragen wird.

6. Biosensor nach Anspruch 1 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran auf den wasserhaltigen und oder leitfähigen kovalent oder ionisch vernetzten Polymeren, Biopolymeren, Gelen, Dendrimern oder kristallinen Festkörpern kovalent gebunden ist.

7. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er einen Rahmen für die Membran aufweist, der durch Photostrukturieren einer Dünnschicht von Polymeren, Gläsern, Keramiken, Kohlenstoff, Metallen oder Halbleitern erzeugt ist.

8. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Kanalmoleküle aus Peptiden oder Proteinen verwendet werden.

9. Biosensor nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanäle Peptidkanäle mit einer 6.3 Helix verwendet werden.

10. Biosensor nach Anspruch 1, 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanäle Peptidkanäle aus Gramicidinen, modifizierten Gramicidinen und deren kovalent verknüpften Dimeren insbesondere N-terminal verknüpften Dimeren verwendet werden.

11. Biosensor nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanäle kovalent vernetzte Alamethicin Kanäle verwendet werden.

12. Biosensor nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanäle stabile monomere Bakterientoxine verwendet werden.

13. Biosensor nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Liganden am oder nahe dem Carboxyterminus des Kanalpeptids gebunden sind.

14. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanäle synthetische zyklische Peptide oder zyklische aus Zuckereinheiten aufgebaute Moleküle wie hydrophob modifizierte Cyclodextrine verwendet werden.

15. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er als Kanäle Löcher in einer Membran aufweist.

16. Biosensor nach Anspruch 1 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß eine Membran mit Löchern, hergestellt durch radioaktiven Beschuss der Membran, durch naßchemisches Ätzen, durch Plasmaätzen, durch Aufbau einer Isolationsschicht um leitende Inseln, mit nanotechnologischen Scannern oder Stempeltechniken, verwendet wird.

17. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran auf einer Seite von einer wässrig/organischen oder organischen oder siliziumorganischen Flüssigkeit bedeckt ist.

18. Biosensor nach Anspruch 1 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß in der organischen oder siliziumorganischen Flüssigkeit Salze oder Ionencarrier gelöst sind.

19. Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA mit Hilfe eines Biosensors nach den Ansprüchen 1, 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die durch die Hybridisierung in den Membrankanälen hervorgerufene Änderung des Ionen- und/oder Elektronenstroms gemessen wird.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß zur Verstaerkung der kanalstromaendernden Wirkung der Hybridisierung DNA- und/oder RNA-interkalierende Substanzen eingesetzt werden.

21. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß zur Verstaerkung der kanalstromaendernden Wirkung der Hybridisierung DNA- und/oder RNA-bindende Proteine eingesetzt werden.

22. Verwendung des Biosensors nach Anspruch 1 zur Bestimmung humaner, pflanzlicher, tierischer, viraler oder bakterieller DNA und RNA.

23. Verwendung des Biosensors nach Anspruch 1 zum Nachweis von Viren der Herpes und HIV Gruppe.

24. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran zusaetzlich zu Lipiden nach Figur 4/I auch andere lipophile Komponenten in die Membran eingebaut sind, insbesondere um dadurch deren Eigenschaften wie Schmelzbereich, Phasenbildung, Fluiditaet und Lösungsverhalten zu modulieren.

25. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Verstaerkung der Haftung vorgeschlagene Verwendung von Organoborverbindungen durch Verwendung von Boronsaeure-derivatisierten Lipiden und einem Hydroxylgruppen-enthaltenden Traegermaterial vorgenommen wird.

26. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Verstaerkung der Haftung vorgeschlagene Verwendung von Organoboronverbindungen durch Verwendung von Boronsaeure-derivatisierten Traegermaterialien und Hydroxylgruppen-enthaltenden Lipiden vorgenommen wird.

27. Biosensor nach Anspruch 1 und 25 oder 1 und 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydroxylverbindungen vicinale Diolstrukturen aufweisen.

28. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Lipide nach Figur 4/I, bevorzugt jedoch Lipide nach Figur 4/II und Figur 4/III verwendet werden.

29. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Transmembranketten der Lipide nach Figur 4/I durch Linker verbunden sind, welche reaktive Boronsaeure- oder Silizumderivate tragen.

30. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Transmembranketten der Lipide nach Figur 4/I durch Linker aus Maleinsaeureestern verbunden sind.

31. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Transmembranketten der Lipide nach Figur 4/I durch Linker aus Maleinsaeureestern verbunden sind und diese durch Polymerisation hochmolekulare, polymere Lipide formen.

32. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Transmembranketten der Lipide nach Figur 4/I durch Linker aus Maleinsaeureestern

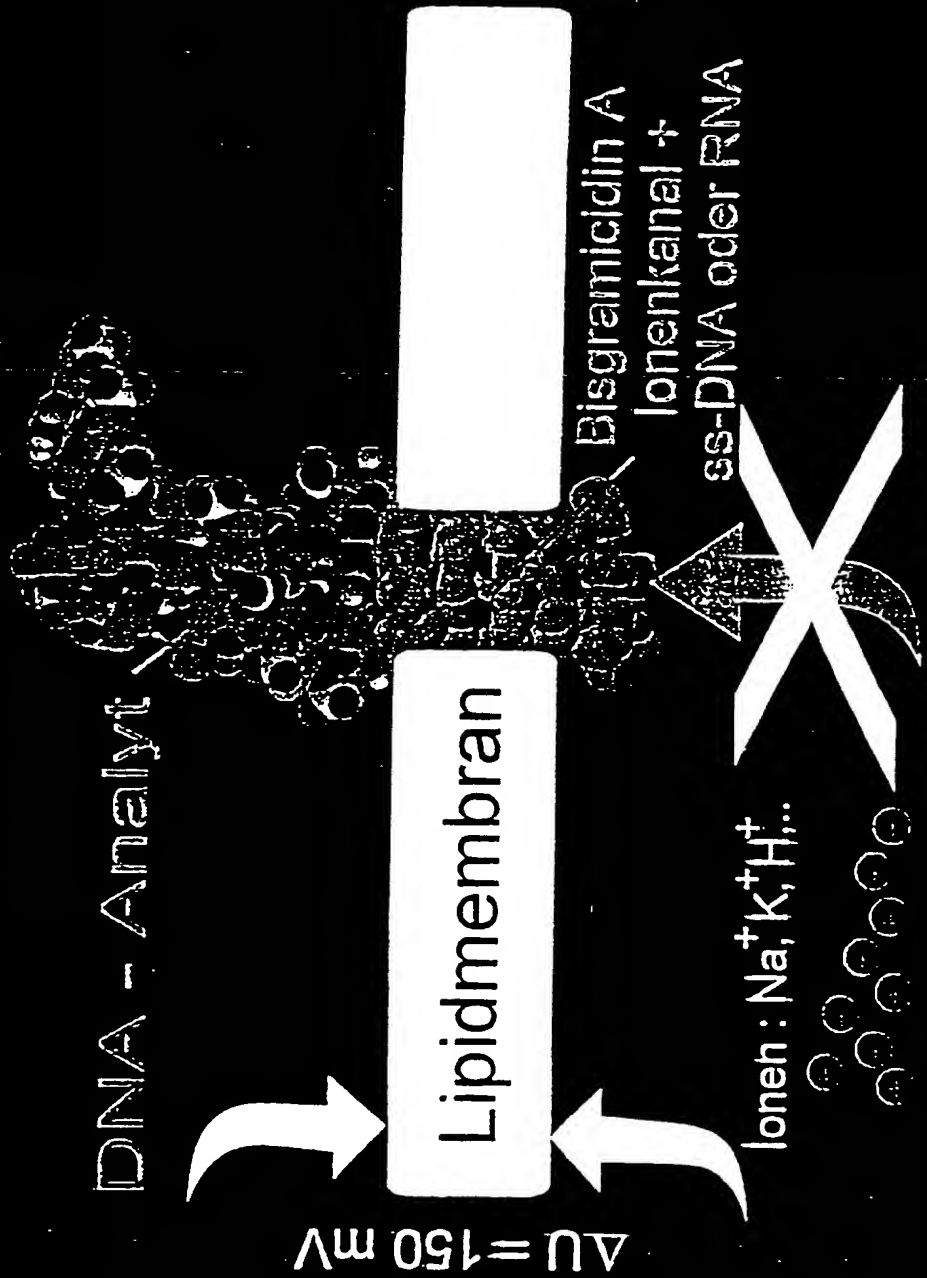
verbunden werden, welche danach durch Oxidation mit z.B. Osmiumtetroxid in vicinale cis-Diole umgewandelt werden.

33. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die cis-Diole mit Boronsäuren der benachbarten Schicht Addukte bilden.

34. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Transmembranketten der Lipide nach Figur 4/I durch Linker aus Maleinsäureestern verbunden werden, welche danach durch Addition von Thiolen, beispielsweise Hydroxyalkylthiolen oder Mercaptopropylsilanen derivatisiert oder vernetzt werden.

35. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Transmembranketten der Lipide nach Figur 4/I durch Linker aus Maleinsäureestern verbunden werden, welche danach durch Addition von Borverbindungen, insbesondere Borhalogeniden derivatisiert werden.

Ionenfluß modulierender Peptidkanal- DNA/RNA-Biosensor



Ionenfluß modulierender Peptidkanal- DNA/RNA-Biosensor

Hoechst-33258

DNA - Analyt

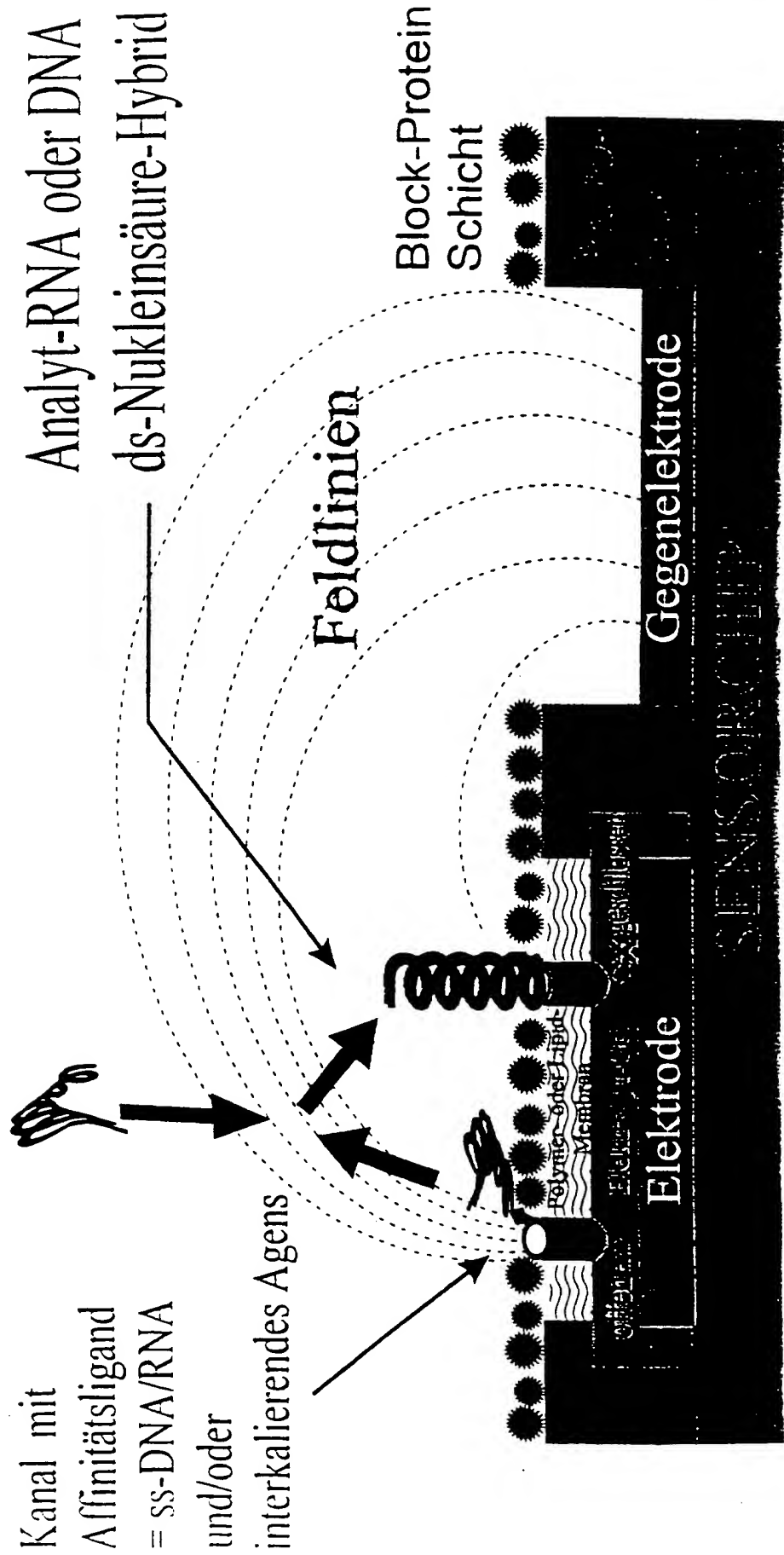
 $\Delta U = 150 \text{ mV}$

Lipidmembran

Bisgramicidin A
IonenkanalIonen : Na^+ , K^+ , H^+ , ...

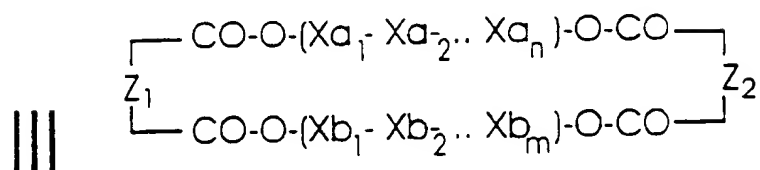
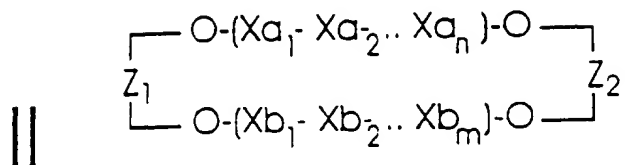
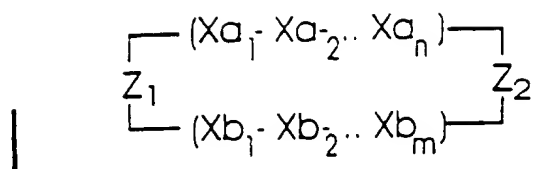
Fig. 3

Analyt-DNA oder RNA



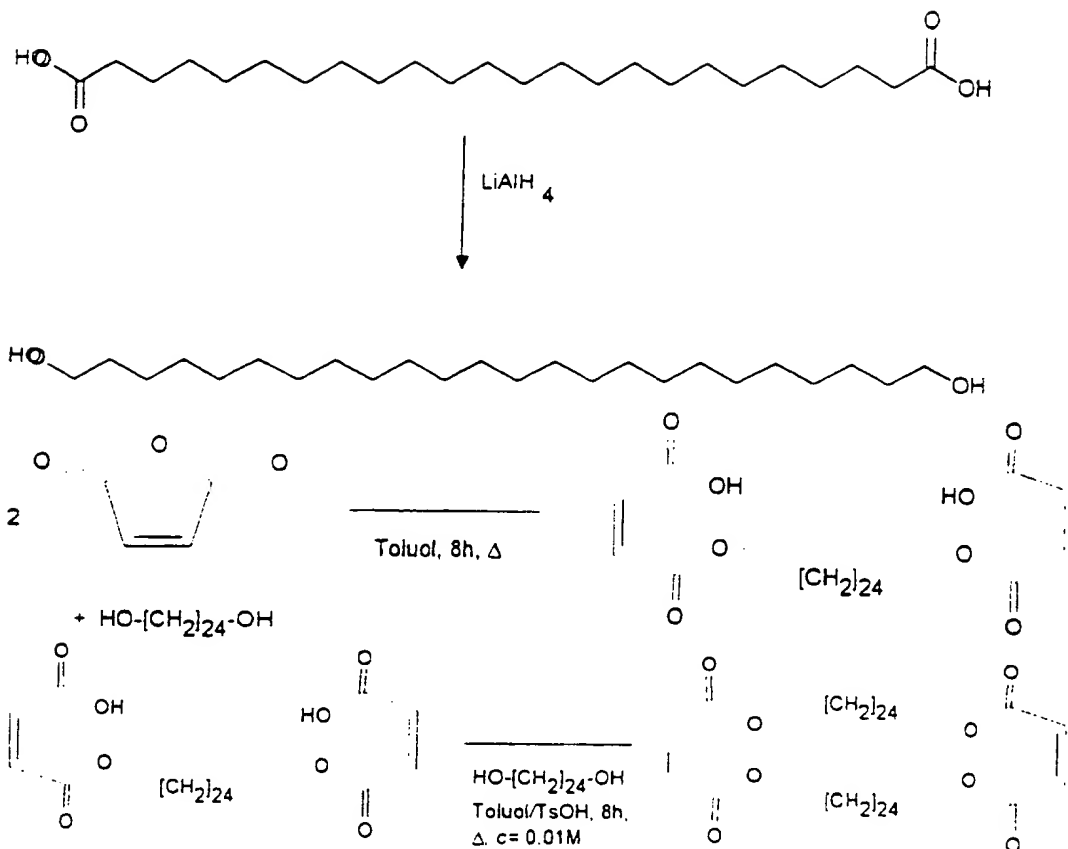
- Fig. 4 -

Formeln I, II und III:



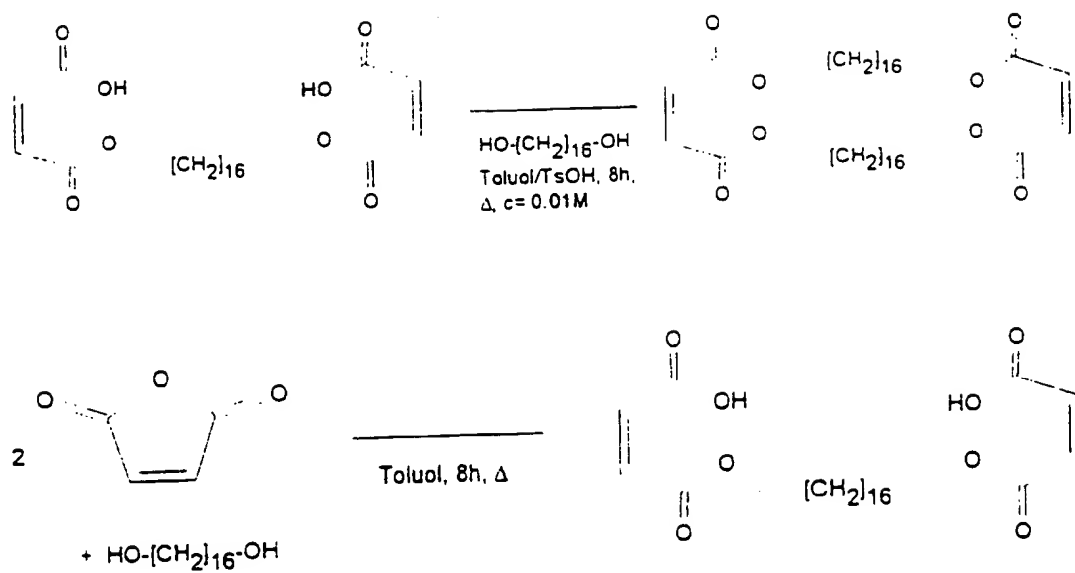
- Fig. 5 -

Reaktionsgleichung:



- Fig. 6 -

Reaktionsvorschrift:



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 EP / AT 96/00230

 CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 G01N27/327 C12Q1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 89 01159 A (COMMW SCIENT IND RES ORG) 9 February 1989 see the whole document ---	1,19
A	US 4 388 166 A (SUZUKI SHUICHI ET AL) 14 June 1983 see the whole document ---	1,19
A	DE 40 27 728 A (BAYER AG) 5 March 1992 see the whole document ---	1,19
A	EP 0 441 120 A (YEDA RES & DEV) 14 August 1991 cited in the application see the whole document ---	1,19
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- * 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- * 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * 'X' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * 'Y' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- * '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 February 1997

Date of mailing of the international search report

5-03-1997

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer:

Moreno, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Applicant's Address

U./AT 96/00230

(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages

Relevant to claim No.

A	<p>US 5 234 566 A (OSMAN PETER D J ET AL) 10 August 1993 cited in the application see the whole document -----</p>	1,19
---	--	------

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

BNSOOCID: <WO 9720203A1>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/AT 96/00230

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8901159 A	09-02-89	AT 113724 T	15-11-94
		AU 2127988 A	01-03-89
		CA 1335879 A	13-06-95
		DE 3852036 D	08-12-94
		DE 3852036 T	09-03-95
		EP 0382736 A	22-08-90
		JP 3503209 T	18-07-91
		US 5436170 A	25-07-95
US 4388166 A	14-06-83	JP 1365389 C	26-02-87
		JP 56027643 A	18-03-81
		JP 61029667 B	08-07-86
		EP 0025110 A	18-03-81
DE 4027728 A	05-03-92	AT 135745 T	15-04-96
		DE 59107591 D	25-04-96
		WO 9204465 A	19-03-92
		EP 0546032 A	16-06-93
		JP 6500465 T	20-01-94
EP 0441120 A	14-08-91	IL 93020 A	29-06-95
		AT 130938 T	15-12-95
		AU 625017 B	25-06-92
		AU 6924591 A	11-07-91
		CA 2033776 A	10-07-91
		DE 69114870 D	11-01-96
		DE 69114870 T	29-08-96
		ES 2082867 T	01-04-96
		JP 6090736 A	05-04-94
		US 5204239 A	20-04-93
US 5234566 A	10-08-93	AT 136119 T	15-04-96
		AU 4078789 A	23-03-90
		WO 9002327 A	08-03-90
		CA 1315338 A	30-03-93
		DE 68926118 D	02-05-96
		DE 68926118 T	22-08-96
		EP 0432188 A	19-06-91

Form PCT ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Patentamt

PCT/AT 96/00030

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N27/327 C12Q1/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfung (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfungsfall gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 89 01159 A (COMMW SCIENT IND RES ORG) 9. Februar 1989 siehe das ganze Dokument ---	1,19
A	US 4 388 166 A (SUZUKI SHUICHI ET AL) 14. Juni 1983 siehe das ganze Dokument ---	1,19
A	DE 40 27 728 A (BAYER AG) 5. März 1992 siehe das ganze Dokument ---	1,19
A	EP 0 441 120 A (YEDA RES & DEV) 14. August 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,19
-/-		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

* A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

* E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

* L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

* O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

* P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* &* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Februar 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

- 5 -03- 1997

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreno, C

[Fortsetzung] ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
A	US 5 234 566 A (OSMAN PETER D J ET AL) 10. August 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1,19

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung und die zur selben Patentfamilie gehören

Int. Pat. Anmeldezeichen

PCT/AT 96/00030

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitgliedern der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 8901159 A	09-02-89	AT 113724 T	15-11-94
		AU 2127986 A	01-03-89
		CA 1335879 A	13-06-95
		DE 3852036 D	08-12-94
		DE 3852036 T	09-03-95
		EP 0382736 A	22-08-90
		JP 3503209 T	18-07-91
		US 5436170 A	25-07-95
US 4388166 A	14-06-83	JP 1365389 C	26-02-87
		JP 56027643 A	18-03-81
		JP 61029667 B	08-07-86
		EP 0025110 A	18-03-81
DE 4027728 A	05-03-92	AT 135745 T	15-04-96
		DE 59107591 D	25-04-96
		WO 9204465 A	19-03-92
		EP 0546032 A	16-06-93
		JP 6500465 T	20-01-94
EP 0441120 A	14-08-91	IL 93020 A	29-06-95
		AT 130938 T	15-12-95
		AU 625017 B	25-06-92
		AU 6924591 A	11-07-91
		CA 2033776 A	10-07-91
		DE 69114870 D	11-01-96
		DE 69114870 T	29-08-96
		ES 2082867 T	01-04-96
		JP 6090736 A	05-04-94
		US 5204239 A	20-04-93
US 5234566 A	10-08-93	AT 136119 T	15-04-96
		AU 4078789 A	23-03-90
		WO 9002327 A	08-03-90
		CA 1315338 A	30-03-93
		DE 68926118 D	02-05-96
		DE 68926118 T	22-08-96
		EP 0432188 A	19-06-91

Formblatt PCT/ISA:210 (Anhang Patentfamilie/Juli 1992)

